

黑土固氮菌功能多样性及对玉米的减氮促生作用

李畅^{1,2}, 刘春利^{1,2}, 张云君^{1,2}, 于运凯³, 王立达³, 张春辉¹, 刘缨^{2*},
郑艳宁^{2*}

1 山西农业大学 农学院, 分子农业与生物能源研究所, 山西 晋中

2 中国科学院微生物研究所, 微生物多样性与资源创新利用全国重点实验室, 北京

3 黑龙江省农业科学院齐齐哈尔分院, 黑龙江 齐齐哈尔

李畅, 刘春利, 张云君, 于运凯, 王立达, 张春辉, 刘缨, 郑艳宁. 黑土固氮菌功能多样性及对玉米的减氮促生作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3432-3446.

LI Chang, LIU Chunli, ZHANG Yunjun, YU Yunkai, WANG Lida, ZHANG Chunhui, LIU Ying, ZHENG Yanning. Nitrogen-fixing bacteria from black soil with functional diversity promote maize growth with reduced fertilizer use[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(8): 3432-3446.

摘要: 氮肥是农业种植的重要化学肥料, 也是作物增产的关键肥力因素, 然而土壤中氮肥缺乏或过量施用会引起农田土壤酸化、板结和作物减产等一系列问题。固氮菌通过固氮酶将空气中的氮还原为作物可吸收的氨, 进而提高土壤质量并促进作物生长。【目的】从东北黑土中筛选固氮菌资源, 探究其对黑土质量提升和玉米生长的促进作用, 为开发适配东北黑土环境的微生物菌剂提供优质菌种资源。【方法】采用微生物分离培养与功能表征技术测定所获固氮菌的固氮、解磷及吲哚-3-乙酸分泌能力; 通过玉米盆栽试验及土壤理化性质分析评价固氮菌对土壤质量和玉米生长的影响。【结果】从东北黑土中获得3株固氮菌, 其中类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.) AHC-20固氮能力较强; 拉乌尔菌(*Raoultella* sp.) Z93和副伯克霍尔德菌(*Paraburkholderia* sp.) W22为多功能菌株, 兼具固氮、解磷和吲哚-3-乙酸生成能力。将这3株固氮菌施用于玉米黑土盆栽, 减施化肥并施加固氮菌AHC-20的处理组的玉米株高、生物量和叶绿素含量均显著高于全肥对照组; 黑土中无机碳、有机碳、有机质、铵态氮和硝态氮含量明显增加, 表明高效固氮菌AHC-20在玉米减肥促生和黑土肥力提升方面效果良好。【结论】黑土固氮菌能有效促进玉米生长并改善黑土质量, 实现“减肥不减产”, 具有良好的固氮微生物菌剂开发潜力。

关键词: 黑土; 固氮菌; 促生潜力; 玉米促生; 土壤改良

资助项目: 中国科学院战略性先导科技专项(A类)(XDA28030201)

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (Class A) (XDA28030201).

*Corresponding authors. E-mail: ZHENG Yanning, zhengyn@im.ac.cn; LIU Ying, liuying@im.ac.cn

Received: 2025-06-04; Accepted: 2025-07-14

Nitrogen-fixing bacteria from black soil with functional diversity promote maize growth with reduced fertilizer use

LI Chang^{1,2}, LIU Chunli^{1,2}, ZHANG Yunjun^{1,2}, YU Yunkai³, WANG Lida³, ZHANG Chunhui¹, LIU Ying^{2*}, ZHENG Yanning^{2*}

1 Institute of Molecular Agriculture and Bioenergy, College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi, China

2 State Key Laboratory of Microbial Diversity and Innovative Utilization, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

3 Qiqihar Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar, Heilongjiang, China

Abstract: Nitrogen fertilizer is an important chemical fertilizer for agricultural planting and an important fertility factor for increasing crop yields. Lack or excess of nitrogen fertilizer in soil will lead to soil acidification, soil consolidation, low crop yields and so on. Nitrogen-fixing bacteria can reduce nitrogen in the air to ammonia that is beneficial to crops through the action of nitrogenase. This process helps improve soil quality and subsequently promote crop growth. **[Objective]** To obtain nitrogen-fixing bacteria from the black soil of northeast China and explore the effects of nitrogen-fixing bacteria on soil quality and maize growth, thus providing excellent strain sources for the development of microbial agents suitable for the environment of black soil in northeast China. **[Methods]** We employed microbial isolation, culture, and functional characterization to measure the nitrogen fixation, phosphorus solubilization, and indole-3-acetic acid (IAA) secretion of the screened nitrogen-fixing bacteria. Pot experiments and soil physical and chemical tests were carried out to evaluate the effects of nitrogen-fixing bacteria on soil quality and maize growth. **[Results]** Three strains of nitrogen-fixing bacteria were obtained from the black soil of northeast China. Among them, *Paenibacillus* sp. AHC-20 had higher nitrogen-fixing ability, while *Raoultella* sp. Z93 and *Paraburkholderia* sp. W22 were multifunctional strains capable of fixing nitrogen, solubilizing phosphorus, and producing IAA at the same time. The three nitrogen-fixing strains were then applied to the black soil planted with maize. The plant height, biomass, and chlorophyll content of maize significantly increased in the chemical fertilizer reduction+AHC-20 group compared with those in the control group with application of only chemical fertilizer. In addition, the content of inorganic carbon, organic carbon, organic matter, ammonium nitrogen, and nitrate nitrogen in black soil also increased significantly, which indicated that the efficient nitrogen-fixing bacterial strain AHC-20 promoted maize growth upon chemical fertilizer reduction and improved the fertility of black soil. **[Conclusion]** Nitrogen-fixing bacteria in black soil can effectively promote the growth of maize and improve the quality of black soil to achieve fertilizer reduction without compromising crop yields, showing the potential for the development of nitrogen-fixing microbial agents.

Keywords: black soil; nitrogen-fixing bacteria; growth-promoting potential; corn to promote growth; soil improvement

氮是作物生长和土壤环境平衡的重要营养元素之一，是氨基酸、叶绿素，以及各种初级

和次级代谢物的组成成分，同时参与作物色素合成、养分循环和抗逆生长等过程，在植物营

养与代谢中发挥关键作用。在作物生长发育过程中,氮对抵御外来生物入侵至关重要,因此氮缺乏可直接降低粮食作物产量和品质^[1-3]。氮肥是作物种植的重要化学肥料,通常以尿素形式施用。然而农田土壤既存在氮素匮乏,又面临氮肥过量问题,过量施用会引发一系列环境问题。据前人调查,我国氮肥利用率为30%–35%,仍低于部分国家水平,在贫瘠地区利用率甚至更低^[4-5]。合理施用氮肥、提高氮肥利用率是作物增产增效和改善土壤环境的重要措施。面对人口压力和粮食质量需求,降低农业生产对化学氮肥的过度依赖,对绿色农业可持续发展意义重大。

微生物固氮指固氮微生物在固氮酶作用下将空气中的氮还原为氨,供植物吸收并改良土壤环境的过程。将固氮微生物制成菌剂施用,在绿色农业中具有多方面意义^[6-7]。微生物固氮主要分为自生固氮、联合固氮和共生固氮3种方式^[8]。自生固氮指细菌本身携带固氮酶基因,可独立完成固氮,当氮素满足自身需求后固氮作用受抑制^[9]。联合固氮依靠植物根系供能,使联合固氮或部分自生固氮微生物在根际繁殖并固氮。目前,小麦、水稻、玉米等作物均存在联合固氮体系,尤以玉米和甘蔗研究最为深入^[10-11]。共生固氮指固氮微生物与植物形成特定共生关系实现固氮,其中豆科植物—根瘤菌共生体系效率较高^[12-13]。利用固氮微生物提供氮源或替代部分化学氮肥是农业生产中最环保高效的氮素供应方式。

多项研究表明施用微生物肥料可减少化肥用量、促进植物生长并提高产量,有利于农业可持续发展^[14-16]。Song等^[7]发现,在减氮条件下接种圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)可改善玉米生长、提高产量并增强抗虫性。Li等^[17]指出,不同微生物肥料可影响玉米产量和土壤肥力,显著提升土壤养分和酶活性,改善土壤微生物环境。Wang等^[18]报道,水稻接种贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) FH-1和缺陷短

波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*) NYM3后根系氮素含量提高,土壤微生物数量和多样性增加,土壤全氮与速效钾含量显著提升,土壤环境得到改良。Fox等^[19]研究表明,玉米和小麦接种假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) pf-5 X940可促进籽粒产量,改善耕作层微环境,提升土壤和植株养分,从而促进作物生长。由此可见,微生物菌剂通过与复杂土壤生态系统互作改善微生物群落结构,为作物创造良好生长环境,以促生为主的微生物菌剂受到广泛关注。

尽管微生物氮肥优势显著,但完全替代化学氮肥仍存在困难。将微生物氮肥与化学氮肥结合可提高肥料利用率、改善土壤理化性质、减轻环境污染,并实现作物稳产,对推动农业可持续发展具有重要现实意义。本研究从东北黑土中分离固氮微生物,评价其固氮、解磷和吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)生成能力,并通过玉米盆栽试验考察固氮菌对玉米生长及土壤环境的影响,以期研发高效促生固氮菌剂,为微生物肥料部分替代化学肥料提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品和玉米种子

用于分离固氮菌的土壤分别采集自黑龙江省海伦市(127°32′16″E, 47°42′58″N)白桦根际及黑龙江省五常市(127°3′25″E, 44°49′45″N)水稻根际。盆栽试验用黑土取自黑龙江省齐齐哈尔市克山县(125°49′12″E, 48°0′36″N)。该土壤基本理化性质: pH 7.6, 全磷(total phosphorus, TP) 669.6 mg/kg, 速效磷(available phosphorus, AP) 99.0 mg/kg, 速效氮(available nitrogen, AN) 76.7 mg/kg、总碳(total carbon, TC) 212.6 mg/kg, 土壤有机质(soil organic carbon, SOC) 167.7 mg/kg。

供试玉米品种为‘富尔116’,购自齐齐哈尔市某公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

1×PBS: 分别称取 8.00 g NaCl、0.20 g KCl、1.42 g Na₂HPO₄ 和 0.27 g KH₂PO₄, 用蒸馏水定容至 1 L, 然后调节 pH 值至 7.0; 2×PBS (仅含钠盐): 首先分别将 31.2 g NaH₂PO₄·2H₂O 和 71.6 g Na₂HPO₄·12H₂O 定容于 1 L 去离子水, 以分别制备 0.2 mol/L NaH₂PO₄ 和 0.2 mol/L Na₂HPO₄ 溶液, 然后将 190 mL 0.2 mol/L NaH₂PO₄ 和 810 mL 0.2 mol/L Na₂HPO₄ 进行混合, 调节 pH 值至 7.0。

磷酸二氢钾购自国药集团化学试剂有限公司; 酒石酸锶钾、钼酸铵、甘露醇、钼酸钠购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 抗坏血酸购自北京百灵威科技有限公司; 硫酸镁购自上海吉至生化科技有限公司; 4% 戊二醛溶液: 采用 0.1 mol/L 的 PBS 配制, 由 25% 戊二醛溶液稀释而成; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 2×M5 Semi-Fidelity PCR Mix 购自北京聚合美生物科技有限公司。

全自动工业分析仪, ThermoFisher Scientific 公司; 总有机碳总氮分析仪, Vario 公司; 紫外可见分光光度计, 上海佑科仪器仪表有限公司; 扫描电镜, 日立公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, 固体培养基在液体培养基的基础上添加 15 g/L 的琼脂粉^[20]; 富集培养液^[21]; 氮化培养基^[21]; 无氮培养基^[22]; 蒙金娜无机磷培养基^[23]; 限氮培养基^[24]。培养基中所有试剂都配成高浓度母液, 其中谷氨酸过滤除菌, 葡萄糖配成高浓度母液单独灭菌, 柠檬酸铁、CaCl₂·2H₂O 分别单独灭菌, 其余成分混匀后 115 °C 灭菌 30 min, 最终定容至 1 L。R2A Broth^[25]购自北京酷来搏科技有限公司。

1.2 固氮菌株的筛选与功能测定

1.2.1 菌株分离培养与分子鉴定

称取黑土 1 g, 加 9 mL 生理盐水, 30 °C、

200 r/min 振荡培养过夜, 静置 15 min。按 10 倍梯度稀释至 10⁻⁶, 取 10⁻³-10⁻⁶ 各 100 μL 涂布相应培养基, 每梯度 3 个重复, 30 °C 倒置培养, 挑取单菌落划线纯化, 获得纯培养^[26]。

1.2.2 16S rRNA 基因测序分析

以纯化后的菌落为模板, 用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μL): 2×M5 Semi-Fidelity PCR Mix 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, ddH₂O 9 μL。PCR 反应程序: 95 °C 3 min; 94 °C 25 s, 55-59 °C 25 s, 72 °C 30 s, 34 个循环; 72 °C 6 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶检测后送北京擎科生物科技股份有限公司测序, 所得序列与 EzBioCloud 数据库 (<https://www.ezbiocloud.net>)^[27] 比对, 确定相近模式菌株。

1.2.3 固氮酶活性测定

采用乙炔还原法测定固氮酶活性^[25]。活化菌株按 1:100 接入 LB 液体培养基, 30 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 去离子水洗 2 次后, 以限氮培养基重悬至 OD₆₀₀=0.3-0.5, 取 10 mL 注入厌氧管, 抽真空后充氮, 30 °C、200 r/min 预培养 1-2 h, 再注入 10% 乙炔用氢火焰离子化检测器和 Porapak N 柱检测乙烯, 进样器、检测器、柱温分别为 120、60、150 °C, 氦气流速为 25 mL/min, 进样量 100 μL。取 100 μL 气体注入气相色谱记录时间, 并以第 1 次转入乙炔管子的气体为零点, 以不接菌培养基为对照, 每隔相应时间段取样同时记录取样时间及乙烯峰面积, 如公式(1)所示。

$$Y = \frac{5 \times 10^{-9} \times S \times 0.001 \text{ (L)}}{10^{-6} \times 22.4 \text{ (L/nmol)}} \quad (1)$$

式中: Y 为 1 mL 乙烯的摩尔数, S 为乙烯峰面积。

蛋白含量按 Bradford 试剂盒说明书测定。

1.2.4 解磷活性测定

采用钼锑抗比色法测定菌液可溶性磷含

量^[28]。将 $OD_{600}=0.9$ 的解磷菌以 1% 接种量接入蒙金娜无机磷液体培养基, 30 °C、200 r/min 培养 3 d 后取样。解磷菌菌液超声破碎 30 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 取 2.5 mL 上清, 加 5 mL 钼锑显色剂, 定容至 50 mL, OD_{700} 测定吸光值。用磷酸二氢钾绘制标准曲线并计算可溶性磷含量, 同时测定上清液 pH。

1.2.5 生长曲线测定

挑取单菌落接入 LB 液体培养基, 30 °C、200 r/min 培养过夜; 按 1% 转接至 10 mL 新鲜 LB 液体培养基中, 相同条件培养, 间隔时间取样测 OD_{600} 至稳定, 以培养时间为横坐标、 OD_{600} 为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.6 IAA 分泌能力测定

采用 Salkowski 比色法测定菌株的 IAA 分泌能力^[29]。菌株在 R2A 培养基中活化过夜后, 以 1% 接入含 100 mg/L L-色氨酸的 R2A 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 5 d, 7 000 r/min 离心 5 min 取上清; 取 1 mL 上清与等体积 Salkowski 显色液混匀, 避光 30 min, 530 nm 测吸光度, 以 IAA 标准品绘制标准曲线计算含量。

1.2.7 菌株细胞形态观察

菌株 30 °C、200 r/min 培养过夜, 取 0.5 mL 菌液 3 500 r/min 离心 2 min 收集菌体, 0.1 mol/L PBS (仅含钠盐) 洗 3 次; 加 1 mL 4% 戊二醛溶液 (由仅含钠盐的 0.1 mol/L PBS 溶液配制而成), 室温避光固定 30–50 min, 4 °C 再固定 8 h 以上; 依次用 30%、50%、70%、85%、95% 乙醇梯度脱水各 14 min, 再用 100% 乙醇洗脱 3 次; CO_2 冷冻临界点干燥、喷金镀膜后扫描电镜观察^[30]。

1.3 固氮菌对玉米的促生试验

1.3.1 菌液制备与种子处理

将供试菌株划线 LB 平板, 挑取单克隆接入 LB 液体培养基, 30 °C、200 r/min 培养过夜, 8 000×g 离心 5 min 收集菌体, 用无菌水重悬至 $OD_{600}=0.5$ 备用。

玉米种子用 1% 次氯酸钠溶液浸泡消毒

30 min, 蒸馏水冲洗后用 20 mL 菌液浸种 2 h, 取出播种。

1.3.2 玉米盆栽接种试验

选直径 19 cm 的圆柱形棕色花盆, 风干黑土过 2 mm 筛, 每盆装 1.6 kg。设 5 个处理: 施用全肥不接菌对照组记为 100%N; 施用 80% 氮肥同时不接菌对照组记为 80%N; 施用 80% 氮肥且接种 *Paraburkholderia* sp. W22 处理组记为 80%N+W22; 施用 80% 氮肥且接种 *Raoultella* sp. Z93 处理组记为 80%N+Z93; 施用 80% 氮肥且接种 *Paenibacillus* sp. AHC-20 处理组记为 80%N+AHC-20。全肥: 过磷酸钙 0.2 g/盆、尿素 0.2 g/盆、氯化钾 0.1 g/盆, 与土壤混匀后浇水。次日每盆播 3 粒玉米种子, 光 14 h/暗 10 h 室温培养 5–7 d 后, 留壮苗 1 株, 每 5 d 浇水 250 mL。14 d 后每盆追加 10 mL $OD_{600}=0.1$ 菌液, 对照加等量无菌水, 50 d 后取样测定。

1.3.3 盆栽玉米与土壤指标测定

用软尺测量茎基部至植株生长最高处的长度为株高; 土壤表面以上玉米展开的叶片数量为叶片数; 玉米茎基部在土壤表面以上的植株脱水生物量为地上干重, 而玉米茎基部在土壤表面以下的脱水生物量为地下干重。干重测定前清除根际土壤, 然后将玉米植株在 105 °C 烘 30 min, 70 °C 烘至恒重后称量; 采用 80% 丙酮法测定玉米叶片色素含量。取叶片剪成 2 mm 细丝, 称 0.2 g 置于 25 mL 容量瓶, 加 0.5 mL 丙酮、15 mL 80% 丙酮密封瓶口, 室温下置暗处浸提, 待叶片变白色后加入 80% 丙酮定容至 25 mL。用 80% 丙酮调 0, 在 470、646、663 nm 测吸光值; 土壤 1:5 与水混合后静置 5 min, 采用 pH 计测定土壤酸碱度; 将 10 g 土壤加入到 40 mL 浓度为 0.5 mol/L 的 K_2SO_4 溶液中, 在 30 °C、200 r/min 振荡 30 min, 0.45 μ m 滤膜过滤, 总有机碳分析仪测总无机碳、总有机碳、总碳; 土壤有机质=总有机碳×1.724; 土壤铵态氮、硝态氮采用全自动工业分析仪测定。

1.4 数据分析

所有试验设3次生物学重复,用IBM SPSS Statistics 24进行单因素方差分析(one-way ANOVA),多组间差异用Duncan法检验,显著水平 $P<0.05$ 。Origin 2021绘图。

2 结果与分析

2.1 固氮菌株分离与固氮能力评价

三株固氮菌进行固氮能力验证见图1A,菌株AHC-20固氮酶活性最高,为 (57.13 ± 0.26) nmol C_2H_4 /(min·mg protein);菌株Z93和W22分别为 (31.40 ± 1.12) nmol C_2H_4 /(min·mg protein)和 (0.22 ± 0.00) nmol C_2H_4 /(min·mg protein)。生长曲线(图1B)显示,菌株Z93生长最快,1:100接

种条件下2-4 h进入对数生长期。

2.2 固氮菌株的形态特征

利用扫描电镜进行观察,发现W22、Z93、AHC-20这3株固氮菌均为杆状(图2)。菌株W22呈短杆状,表面具凹凸纹理,大小约 $(0.5-1.0)$ $\mu\text{m}\times 0.5$ μm (图2A);菌株Z93呈不规则杆状,表面被分泌物质包裹,大小约 $(1.0-2.0)$ $\mu\text{m}\times 0.4$ μm (图2B);菌株AHC-20为杆状,表面光滑,大小约 $(1.0-2.5)$ $\mu\text{m}\times 0.4$ μm (图2C)。

2.3 固氮菌株16S rRNA基因序列相似性及系统发育分析

基于16S rRNA基因序列,以EzBioCloud数据库比对并采用MEGA 11邻接法构建系统发育树(图3)。菌株W22、Z93、AHC-20分别归属

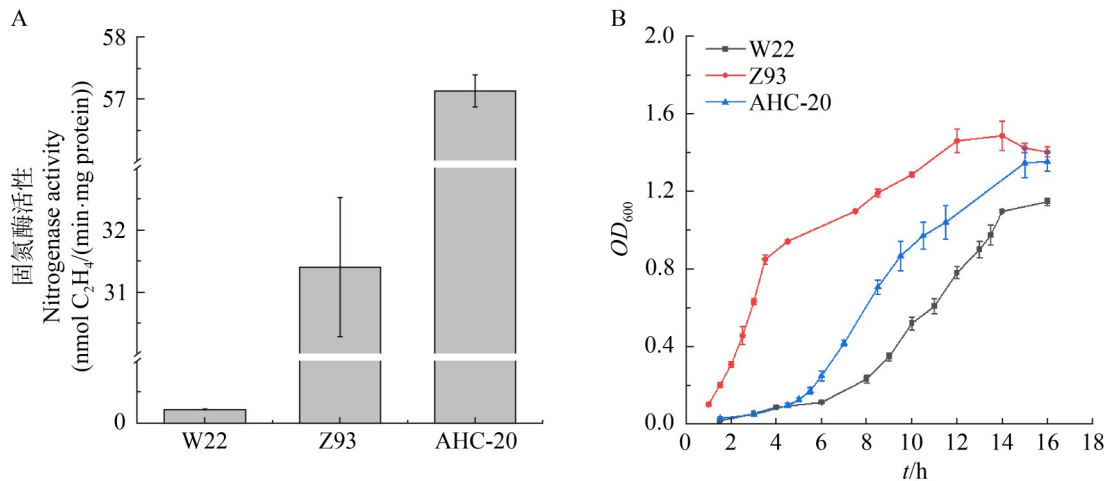


图1 黑土固氮菌固氮能力定量分析与生长速率测定。A: 固氮菌固氮酶活性; B: 固氮菌株的生长曲线。
Figure 1 Quantitative analysis of nitrogen abilities and growth rates of three nitrogen-fixing bacteria isolated from black soil. A: Nitrogenase activity of nitrogen-fixing bacteria; B: Growth curves of nitrogen-fixing strains.

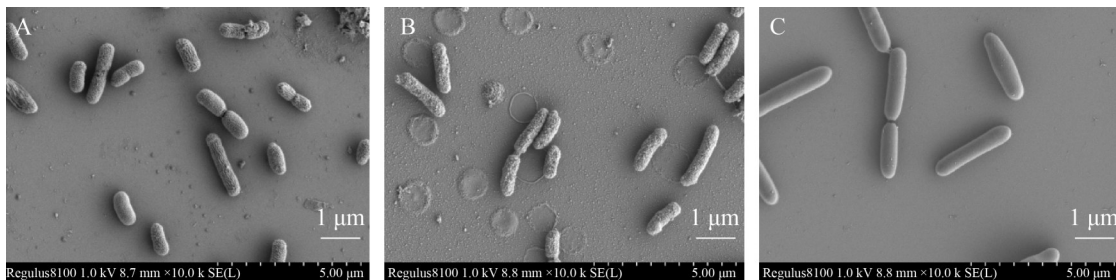


图2 固氮菌细胞形态的扫描电镜图像

Figure 2 Scanning electron microscopy (SEM) images of the cell morphology of three nitrogen-fixing bacteria. A: W22; B: Z93; C: AHC-20.

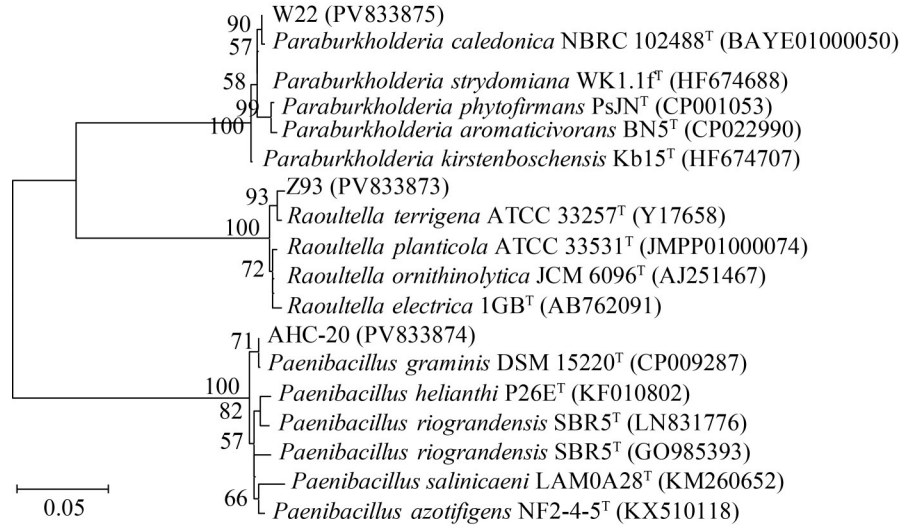


图3 基于固氮菌株16S rRNA基因序列的系统发育树。分支处数值为bootstrap值(仅显示 $\geq 50\%$ 的数值); 括号内为GenBank登录号; 标尺0.05代表进化距离。

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of nitrogen-fixing bacteria. Numbers at nodes indicate bootstrap values (only values $\geq 50\%$ are shown). GenBank accession numbers are in parentheses. The scale bar 0.05 represents evolutionary distance.

Paraburkholderia、*Raoultella* 和 *Paenibacillus* 这 3 个属, *P. caledonica* NBRC 102488^T (BAYE01000050)、土壤柔武氏菌(*R. terrigena*) ATCC 33257^T (Y17658) 和草芽孢杆菌(*P. graminis*) DSM 15220^T (CP009287)的 16S rRNA 基因相似性依次为 100.0%、99.4% 和 99.9%。

2.4 固氮菌株促生能力评价

溶磷能力与 IAA 产量是评价菌株促生潜力的重要标准。定量分析表明(表 1), 菌株 W22 和菌株 Z93 兼具溶磷及 IAA 分泌能力, 其中菌株 Z93 溶磷能力和 IAA 产量最高, 分别为 62.64 mg/L 和 137.13 mg/L; 菌株 AHC-20 未检测到上述能力。

2.5 施用固氮菌对玉米生长的影响

2.5.1 施用固氮菌对玉米株高与叶片数的影响

盆栽试验设置全肥(100%N)和减肥 20% (80%N) 2 个对照组, 并在减肥基础上分别施用 W22、Z93、AHC-20 菌液作为处理组(图 4)。与 100%N 和 80%N 相比, 接种菌株 W22、Z93、

AHC-20 的玉米株高均增加(图 4A), 其中, AHC-20 处理组的玉米株高显著高于 80%N 对照组, 增幅 15.1%。在栽培 50 d 时, AHC-20 处理组的玉米展开叶片数最多(平均为 4-5 片), 而 80%N 处理组的玉米叶片数少于 4 片。相比之下, 接种菌株 W22 和 Z93 的处理组在株高和叶片数上与对照组无显著差异。

2.5.2 施用固氮菌对玉米生物量的影响

所有接菌处理组的地上生物量、地下生物量和总生物量均高于 80%N 不接菌对照组(图 5)。其中, 接种菌株 Z93 和 AHC-20 的处理组地下生物量显著增加(图 5A), Z93 处理组较

表1 分离菌株的促生潜力

Table 1 Plant growth promoting potential of isolated strains

Strains	Phosphate solubilization (mg/L)	IAA (mg/L)
W22	2.49±0.20	2.52±0.35
Z93	62.64±5.00	137.13±1.45
AHC-20	Not detected	Not detected

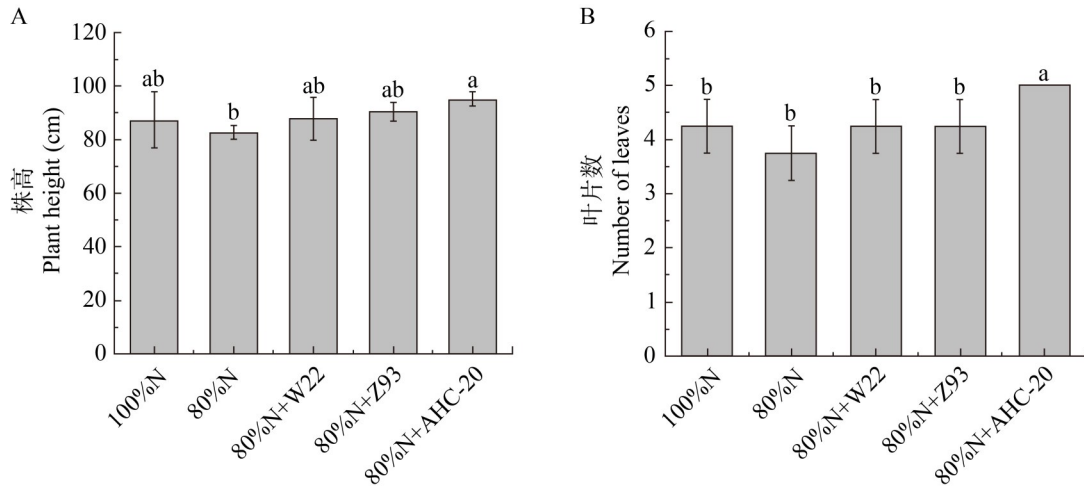


图4 玉米株高(A)和叶片数(B)

Figure 4 Plant height (A) and number of leaves (B) of maize. Different lowercase letters (a, b, ab) above the bars indicate significant differences between groups based on statistical analysis.

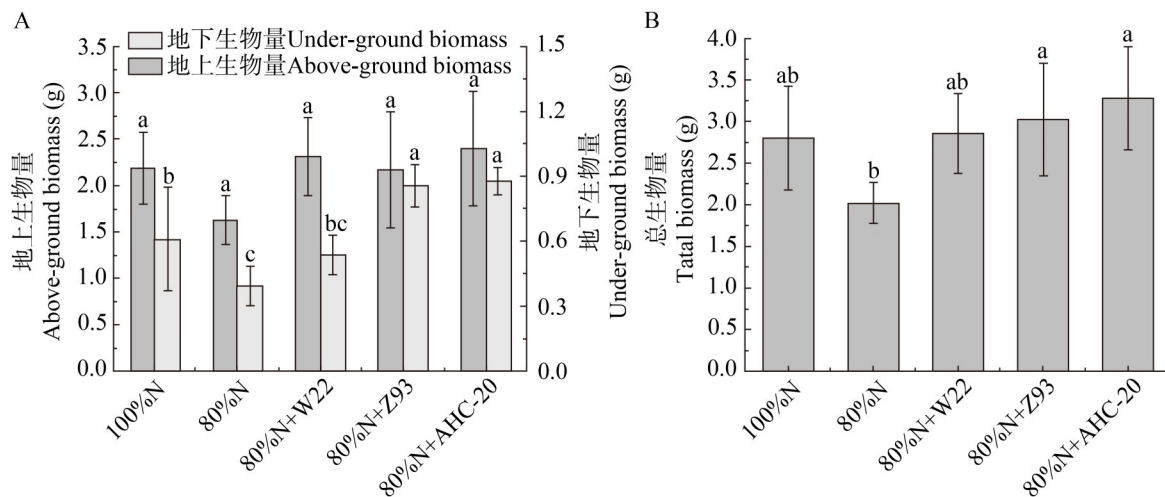


图5 玉米植株生物量的测定。A: 地上生物量和地下生物量; B: 玉米植株的总生物量。

Figure 5 Biomass measurements of maize plants. A: Above-ground and underground biomass; B: Total biomass of maize plants. Different lowercase letters (a, b, c, ab, bc) above the bars indicate significant differences between groups based on statistical analysis.

100%N、80%N 对照组分别提高 40.0% 和 117.1%，AHC-20 处理组分别提高 43.3% 和 122.2%，而地上生物量差异不显著。在总生物量方面，所有接菌处理均高于 100%N 对照组，且 Z93 和 AHC-20 处理组较 100%N 对照组分别提高了 49.3% 和 67.1% (图 5B)。

2.5.3 施用固氮菌对玉米叶片色素含量的影响

接种菌株 AHC-20 的处理组植株各色素显著高于 100%N 和 80%N 对照组(图 6)。与 100%N 对照组相比，Z93 和 AHC-20 处理组的植株叶绿素 a 含量分别提高了 15.1% 和 18.3%，且 AHC-20 处理组的叶绿素 b 含量较 100%N 对照组显著

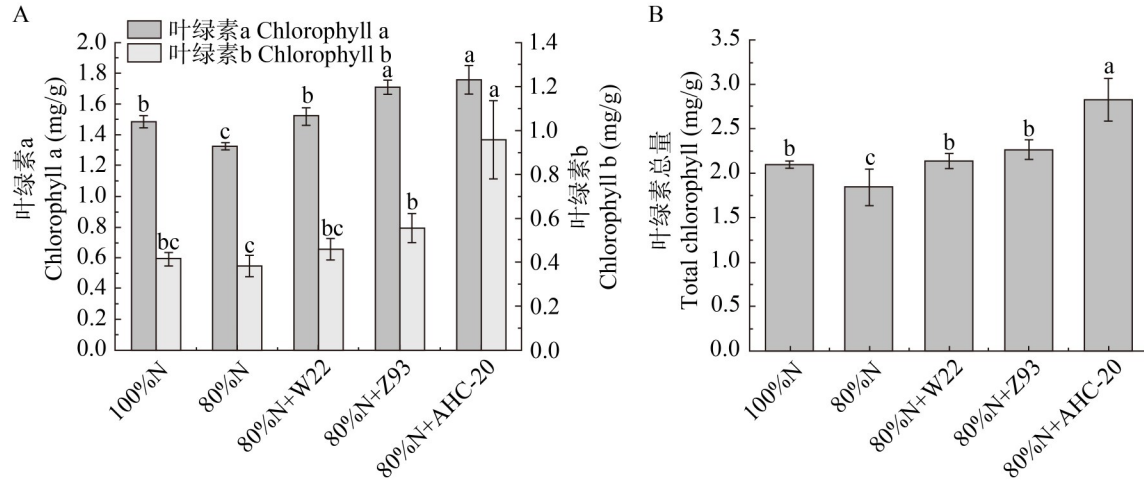


图6 玉米叶片叶绿素含量的测定。A: 叶绿素a、b; B: 叶绿素总量。

Figure 6 Determination of chlorophyll content in maize leaves. A: Chlorophyll a and chlorophyll b; B: Total chlorophyll content. Different lowercase letters (a, b, c, bc) above the bars indicate significant differences between groups based on statistical analysis.

提高 149.3% (图 6A)。与 80%N 对照组相比, 所有处理组的叶绿素总量均增加, 其中 AHC-20 处理组的叶绿素总量较 100%N 和 80%N 对照组分别增加了 34.7% 和 53.4% (图 6B)。

2.6 施用固氮菌对土壤质量的影响

2.6.1 施用固氮菌对土壤碳含量的影响

接种菌株 AHC-20 处理组的土壤无机碳、有机碳、总碳、有机质均高于 100%N 和 80%N 对照组。接种菌株 W22、Z93 处理组的土壤无机碳与 80%N 对照组无显著差异, 且低于 100%N 和 AHC-20 处理组 (图 7A); AHC-20 处理组的土壤无机碳含量较 80%N 对照组提高了 16.5%。Z93 和 AHC-20 处理组的土壤有机碳、有机质含量分别较 100%N 和 80%N 对照组提高了 12.0% 和 14.4% (图 7B、7D)。W22 和 AHC-20 处理组的总碳含量显著高于对照组, 其中 AHC-20 处理组的土壤总碳含量分别比 100%N 和 80%N 对照组提高了 8.8% 和 15.1%; W22 处理组的土壤碳含量分别比 100%N 和 80%N 对照组提高了 3.5% 和 9.4%, 而 Z93 处理组的土壤总碳含量与对照组相比无显著差异 (图 7C)。

2.6.2 施用固氮菌对土壤速效氮与 pH 的影响

如图 8A 所示, 接种菌株 W22 和 AHC-20 的处理组土壤铵态氮较 80%N 对照组显著提高, 其中 AHC-20 处理组的土壤铵态氮提高最明显, 增幅达 16.3%。与 100%N 对照组相比, 所有接菌处理组的土壤硝态氮含量均显著增加, 其中 Z93 处理组的土壤硝态氮含量较 100%N 和 80%N 对照组分别提高了 116.4% 和 76.6%。

所有接菌处理组的土壤 pH 值与 80%N 对照组的无显著差异, 但较 100%N 对照组显著增加, 其中 W22 处理组增加 0.44, 增加最为显著 (图 8B)。这表明化肥施用会降低土壤 pH 值, 导致酸化风险, 而减少化肥用量并配合施用固氮菌剂可有效维持土壤酸碱平衡。

3 讨论与结论

为缓解化学氮肥过量施用带来的环境压力, 微生物菌剂已成为推动农业绿色发展的关键手段。研究表明微生物菌剂可通过提高土壤 pH、补充碳氮等养分改善土壤团粒结构与酸碱平衡,

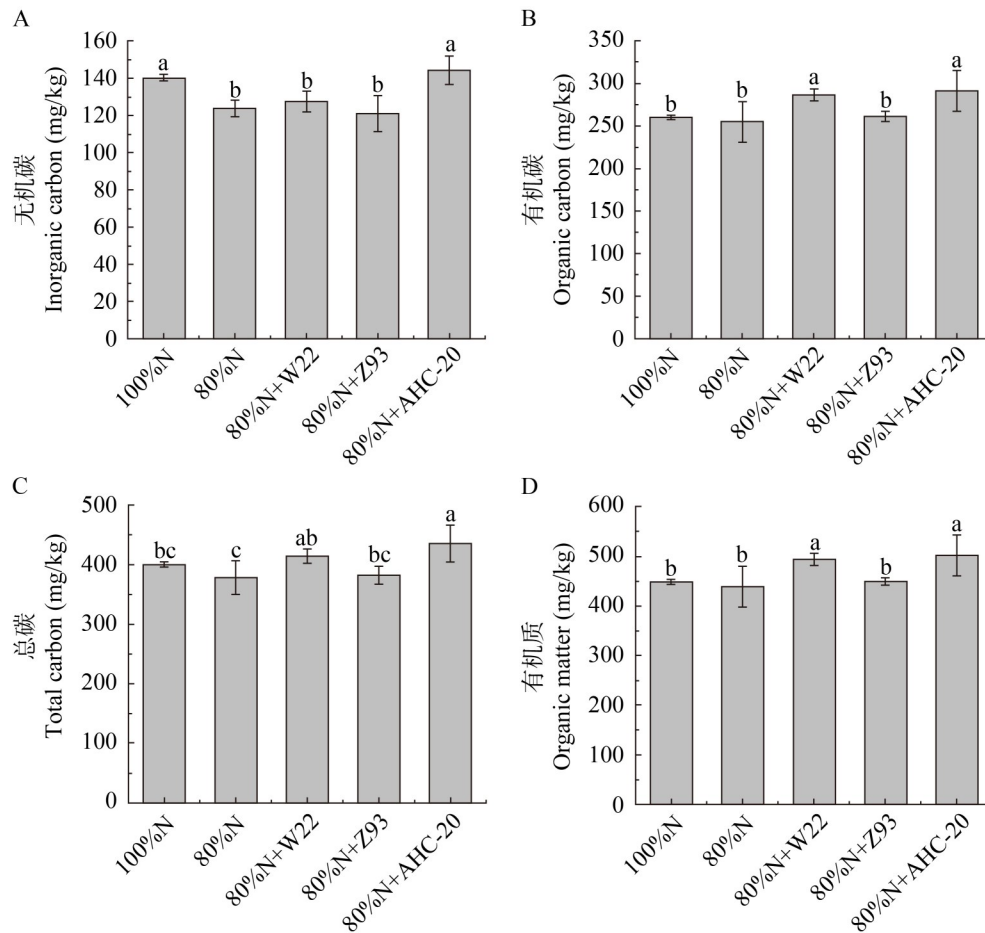


图7 黑土中无机碳(A)、有机碳(B)、总碳(C)以及有机质(D)含量的测定

Figure 7 Measurements of inorganic carbon (A), organic carbon (B), total carbon (C), and organic matter (D) contents in black soil. Different lowercase letters (a, b, c, ab, bc) above the bars indicate significant differences between groups based on statistical analysis.

进而调节根系养分吸收、优化植株营养比例，最终实现增产^[31-33]。Liu 等^[34]研究表明，铵态氮肥与微生物菌剂配施可提高水稻生物量及氮素在茎、叶、籽粒中的分配，并增强根系活力。Sharma 等^[35]的研究发现，菌剂与肥料配合可以提升木豆根长和籽粒产量，同时提高土壤硝态氮、速效磷含量及微生物多样性。Wu 等^[36]研究表明，复合木霉菌剂能增加黄连根际有机质、水解氮和速效磷，并提高微生物丰富度。Bradáčová 等^[37]研究表明，微生物菌剂在不同玉米栽培条件下可提高氧化有机碳、速效氮含量及氮肥利用率。综上所述，微生物菌剂通过调

节土壤养分供应、改善土壤结构与微生物多样性，为农作物的健康生长和高产奠定基础。

长期施用氮肥会显著改变黑土中固氮菌群落、氨化细菌、硝化细菌等与氮循环相关的功能微生物^[38-39]。过量氮肥会降低根际固氮菌的丰富度，抑制其生长^[39-41]。尽管外源氮可提高有机碳含量并为固氮提供能量，但超量氮肥会扰乱氨化与硝化细菌的平衡，导致铵、硝浓度异常，进而影响土壤 pH^[42-45]。因此氮肥用量是决定氮循环微生物结构的关键因素。在玉米上单独或减量配施固氮菌剂均可促进生长：联合施用 C-112 菌剂可增加株高、穗粒数和千粒

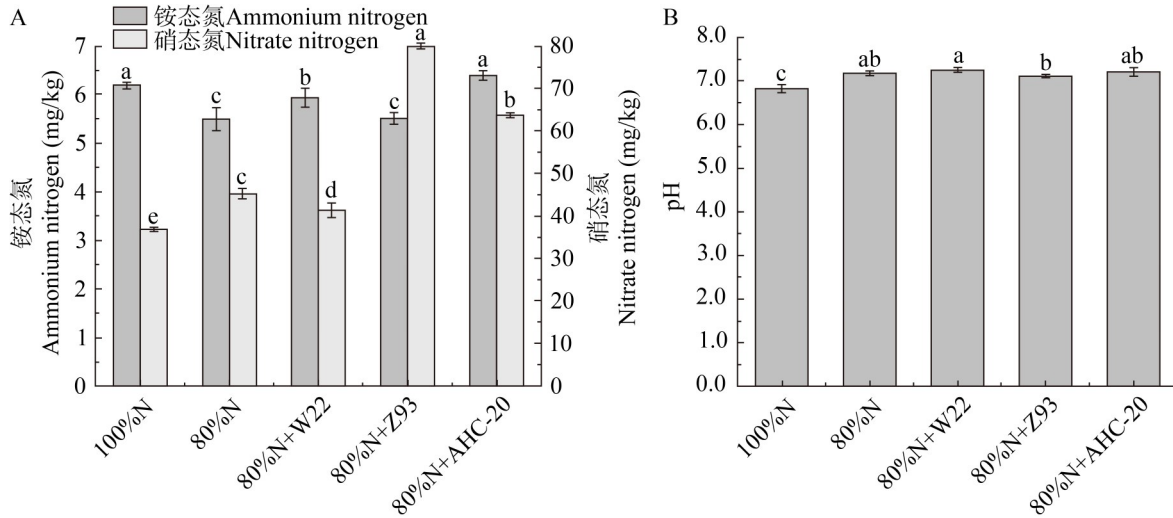


图8 黑土中铵态氮、硝态氮(A)以及土壤pH (B)含量的测定

Figure 8 Measurements of ammonium nitrogen, nitrate nitrogen (A) and pH values in contents (B) black soils. Different lowercase letters (a, b, c, d, e, ab) above the bars indicate significant differences between groups based on statistical analysis.

重^[46]、单独施用 UB1 野生型固氮菌并减氮可提升穗长、行粒数和百粒重^[47]、*A. brasilense* 与氮肥配施显著增加干物质^[48]。综上所述，固氮菌剂在未来农业资源利用中具有重要意义。

本研究自黑土分离获得 3 株固氮菌，系统发育分析将其分别归入 *Paraburkholderia*、*Paenibacillus* 和 *Raoultella* 这 3 个属。乙炔还原法显示，*Paenibacillus* sp. AHC-20 固氮活性最高，*Raoultella* sp. Z93 次之，且 3 株固氮菌的固氮活性存在极显著差异。Gao 等^[49]的研究指出，即使从同一环境中分离，固氮菌的群落组成和功能特性也会因空间尺度不同而显著不同。Zeng 等^[50]的研究也表明，不同微生物的固氮酶结构和组成各异，且其表达和成熟过程受到环境氮水平的严格调控。这些因素均可能影响固氮酶的活性和固氮效率，因此后续分离培养应重点关注适应土壤环境和作物生长条件的固氮菌株，以期应用于农业中。

三株菌的解磷能力和 IAA 生成能力实验表明，*Raoultella* sp. Z93 和 *Paraburkholderia* sp. W22 同时具有固氮、解磷和分泌 IAA 的多功能

促生潜力，且菌株 *Raoultella* sp. Z93 的综合促生效果最佳。

研究表明 *Paraburkholderia*^[6]、*Raoultella*^[51] 和 *Paenibacillus*^[52] 3 个属的菌株具有显著的促生潜能。Beneduzi 等^[53]从麦田中分离获得 *Paenibacillus*，通过温室栽培试验验证其在促进小麦生长和增加干物质积累方面效果显著；Solanki 等^[54]将 *Paraburkholderia* 应用于大豆盆栽和田间种植，其能够促进大豆生长、提高大豆产量，同时起到改善土壤有机碳、有效养分等的功效。Xu 等^[55]从黑麦根系分离出 *Raoultella*，并在白菜盆栽实验中发现其不仅能促进白菜生长和提高产量，还有效改善土壤中镉浓度，显示出在土壤微生物修复方面的潜力。

为了探讨在氮肥减施下功能菌株的应用效果，本研究设置玉米盆栽试验，通过测定玉米株高、叶片数、生物量和叶片色素含量观察功能菌株对玉米表型的影响。结果表明，在减氮配施固氮微生物的实验中，接种菌株 *Paenibacillus* sp. AHC-20 的处理组表现出较高的固氮能力，叶片数和总生物量显著高于 80%N

对照组, 其次是接种 *Raoultella* sp. Z93 的处理组。

氮是构成叶绿素的主要成分, 氮磷缺乏会导致叶片变黄或变红, 而叶片色素含量直接影响光合作用效率。研究表明, 微生物菌剂可提高植株光合作用积累和净光合速率, 促进氮磷吸收^[56-57]。本研究通过测定叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素总量, 分析固氮菌对玉米生长过程中光合作用的影响。与 80%N 对照组相比, 处理组 80%N+Z93 和 80%N+AHC-20 的各色素含量显著增加。综上所述, 固氮菌施用能促进玉米氮循环利用和光合作用, 为玉米生长提供充足氮源, 有望替代部分化肥, 成为环境友好的绿色肥料。

本研究还考察了 3 种固氮菌对土壤肥力和酸碱环境的影响, 结果表明与不接菌的 80%N 对照组相比, 接菌处理组 80%N+AHC-20 的土壤总无机碳含量、总有机碳、总碳含量显著提高, 这可能与固氮微生物分解和积累碳元素, 以及参与玉米根系分泌过程满足植物碳需求有关。土壤碳含量受多种因素的影响, 其中生物因素(如玉米残叶、微生物残体分解)起主导作用^[58]。此外, 处理组 80%N+AHC-20 的土壤铵态氮含量显著高于 80%N 对照组, 而处理组 80%N+Z93 的土壤硝态氮含量显著高于 100%N 和 80%N 对照组。研究表明在适宜的土壤湿度、温度及作物生长条件下, 固氮菌株与土壤微生物群落相互作用可提高作物对不同形式氮养分的吸收利用, 还能促进土壤中硝化细菌、氨化细菌等微生物的活跃度, 从而改良土壤环境^[59]。所有接菌处理组的土壤 pH 值较 100%N 对照组显著提高, 且土壤 pH 均保持在 6.5-7.5 之间, 为适应此 pH 范围的微生物群落提供了良好的生长环境, 促进了土壤微生物反应, 表明这些固氮菌在增加土壤碳含量、改善土壤结构和肥力, 以及调节土壤酸碱环境方面均具有较大潜力。

本研究筛选出高效固氮菌 *Paenibacillus* sp. AHC-20 和多功能固氮菌 *Raoultella* sp. Z93, 在

氮肥减量施用条件下, 对玉米生长表现出显著的促生效果, 能够促进玉米植株生长、提高植株色素含量、促进玉米对氮素的吸收和利用; 此外, 这 2 株固氮菌还具有良好的土壤改良效果, 能够显著提高土壤的铵态氮和硝态氮含量, 进而改善土壤环境。通过单株菌的测定, 本研究明确了 3 株固氮菌的基本特性及其对玉米生长的直接影响, 对其固氮能力、促生效果和土壤适应性有了一定的了解。这些发现可为后续开展组合实验提供参考依据, 也为后续将固氮菌与其他功能菌株(如解磷菌、解钾菌等)进行复配研究奠定初步基础。未来研究可在单株菌的基础上, 进一步探索复配菌株组合对玉米生长的影响, 以期更全面地挖掘微生物在农业应用中的价值, 相关研究结果有助于推动我国东北黑土地的保护与利用, 为实现氮肥的减施增效提供菌株支持。

作者贡献声明

李畅: 负责实验设计、实验操作、数据分析以及撰写文章; 刘春利: 参与实验操作和数据分析; 张云君: 负责数据分析; 于运凯: 提供资源支持并提出稿件修改建议; 王立达: 提出稿件修改建议; 张春辉: 提供实验指导并提出稿件修改建议; 刘缨: 负责稿件指导和修改; 郑艳宁: 负责实验设计、实验指导、结果分析以及稿件指导。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] KISHOREKUMAR R, BULLE M, WANY A, GUPTA KJ. An overview of important enzymes involved in nitrogen assimilation of plants[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2020, 2057: 1-13.
- [2] SUN YF, HU Z, WANG XW, SHEN X, HU SW, YAN Y, KANT S, XU GH, XUE Y, SUN SB. Overexpression of OsPHR3 improves growth traits and facilitates nitrogen

- use efficiency under low phosphate condition[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 166: 712-722.
- [3] XU GH, FAN XR, MILLER AJ. Plant nitrogen assimilation and use efficiency[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63: 153-182.
- [4] 闫湘, 金继运, 梁鸣早. 我国主要粮食作物化肥增产效应与肥料利用效率[J]. *土壤*, 2017, 49(6): 1067-1077.
YAN X, JIN JY, LIANG MZ. Fertilizer use efficiencies and yield-increasing rates of grain crops in China[J]. *Soils*, 2017, 49(6): 1067-1077 (in Chinese).
- [5] 袁旭, 张家安, 常飞杨, 王鑫月, 李寒, 张雪梅. 我国肥料施用现状及化肥减量研究进展[J]. *农业与技术*, 2022, 42(18): 20-23.
- [6] OH ET, RA JS, KIM SB. *Paraburkholderia translucens* sp. nov. and *Paraburkholderia sejongensis* sp. nov., isolated from grassland soil and showing plant growth promoting potential[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2024, 74(4): 006347.
- [7] SONG YY, LIU JW, CHEN FJ. *Azotobacter chroococcum* inoculation can improve plant growth and resistance of maize to armyworm, *Mythimna separata* even under reduced nitrogen fertilizer application[J]. *Pest Management Science*, 2020, 76(12): 4131-4140.
- [8] SOUMARE A, DIEDHIOU AG, THUITA M, HAFIDI M, OUHDOUCH Y, GOPALAKRISHNAN S, KOUISNI L. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture[J]. *Plants*, 2020, 9(8): 1011.
- [9] 王开运, 姜莉莉, 武玉国, 王开元. 超高效固氮菌和生物有机肥的创新与应用前景[J]. *农业科技通讯*, 2017(9): 4-7.
- [10] 胡梦媛, 李雅颖, 葛超荣, 张迎迎, 姚槐应. 禾本科植物联合固氮的研究现状及应用前景[J]. *中国生态农业学报(中英文)*, 2021, 29(11): 1815-1826.
HU MY, LI YY, GE CR, ZHANG YY, YAO HY. Research status and application prospects of combined nitrogen fixation in gramineous plants[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2021, 29(11): 1815-1826 (in Chinese).
- [11] 李明家, 刘冉, 钟永嘉, 李欣欣. 甘蔗联合固氮的研究进展及应用潜力[J]. *微生物学报*, 2021, 61(3): 564-579.
LI MJ, LIU R, ZHONG YJ, LI XX. Current progress on the associative nitrogen fixation in sugarcane and its application potentials[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(3): 564-579 (in Chinese).
- [12] MUS F, CROOK MB, GARCIA K, GARCIA COSTAS A, GEDDES BA, KOURI ED, PARAMASIVAN P, RYU MH, OLDROYD GED, POOLE PS, UDVARDI MK, VOIGT CA, ANÉ JM, PETERS JW. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 3698-3710.
- [13] 徐鹏霞, 韩丽丽, 贺纪正, 罗锋, 张丽梅. 非共生生物固氮微生物分子生态学研究进展[J]. *应用生态学报*, 2017, 28(10): 3440-3450.
XU PX, HAN LL, HE JZ, LUO F, ZHANG LM. Research advance on molecular ecology of asymbiotic nitrogen fixation microbes[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(10): 3440-3450 (in Chinese).
- [14] AHMED M, RAUF M, MUKHTAR Z, AHMAD SAEED N. Excessive use of nitrogenous fertilizers: an unawareness causing serious threats to environment and human health[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(35): 26983-26987.
- [15] SAMMAURIA R, KUMAWAT S, KUMAWAT P, SINGH J, JATWA TK. Microbial inoculants: potential tool for sustainability of agricultural production systems[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(4): 677-693.
- [16] TAYEFEH M, SADEGHI SM, ALI NOORHOSSEINI S, BACENETTI J, DAMALAS CA. Environmental impact of rice production based on nitrogen fertilizer use[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(16): 15885-15895.
- [17] LI XQ, LU QJ, LI DY, WANG DZ, REN XX, YAN JL, AHMED T, LI B. Effects of different microbial fertilizers on growth and rhizosphere soil properties of corn in newly reclaimed land[J]. *Plants*, 2022, 11(15): 1978.
- [18] WANG JJ, ZHAO SQ, XU S, ZHAO W, ZHANG XX, LEI Y, ZHAI HH, HUANG ZY. Co-inoculation of antagonistic *Bacillus velezensis* FH-1 and *Brevundimonas diminuta* NYM3 promotes rice growth by regulating the structure and nitrification function of rhizosphere microbiome[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1101773.
- [19] FOX AR, SOTO G, VALVERDE C, RUSSO D, Jr LAGARES A, ZORREGUIETA Á, ALLEVA K, PASCUAN C, FRARE R, MERCADO-BLANCO J, DIXON R, AYUB ND. Major cereal crops benefit from biological nitrogen fixation when inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(10): 3522-3534.
- [20] 胡展, 雷平, 郭照辉, 杨华, 肖蓉, 罗榕君, 黄军, 付祖姣. 生防放线菌 Ahn75 的荧光标记及其在水稻中的定殖[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2612-2619.
HU Z, LEI P, GUO ZH, YANG H, XIAO R, LUO RJ, HUANG J, FU ZJ. Fluorescent marker of biocontrol actinomycetes Ahn75 and its colonization in rice[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2612-2619 (in Chinese).
- [21] 余涵霞, 梁浩林, 王子轩, 杨晓宇, 李伟华. 蕨甘菊根际可培养固氮菌和氨化细菌的分离鉴定与促生作用[J]. *微生物学报*, 2022, 62(5): 1851-1863.
YU HX, LIANG HL, WANG ZX, YANG XY, LI WH. Isolation, identification and growth-promoting effects of culturable nitrogen-fixing bacteria and ammonifying bacteria in rhizosphere soil of *Mikania micrantha*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1851-1863 (in Chinese).
- [22] ZHANG X, TONG JJ, DONG MM, AKHTAR K, HE B. Isolation, identification and characterization of nitrogen fixing endophytic bacteria and their effects on cassava production[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e12677.
- [23] WANG ZH, ZHANG HH, LIU L, LI SJ, XIE JF, XUE X, JIANG Y. Screening of phosphate-solubilizing bacteria and their abilities of phosphorus solubilization and wheat growth promotion[J]. *BMC Microbiology*, 2022,

- 22(1): 296.
- [24] WANG TS, ZHAO XY, SHI HW, SUN L, LI YB, LI Q, ZHANG HW, CHEN SF, LI JL. Positive and negative regulation of transferred *nif* genes mediated by indigenous GlnR in Gram-positive *Paenibacillus polymyxa*[J]. PLoS Genetics, 2018, 14(9): e1007629.
- [25] 邹卫玲, 冯广达, 李华平, 朱红惠. 废弃铅锌矿石和钨矿砂中可培养细菌多样性分析[J]. 生物技术进展, 2018, 8(5): 450-458.
- ZOU WL, FENG GD, LI HP, ZHU HH. Diversity analyses of culturable bacteria in abandoned lead-zinc ore and tungsten sands[J]. Current Biotechnology, 2018, 8(5): 450-458 (in Chinese).
- [26] LI Q, ZUO YZ, GAO M, CHEN SF. *Paenibacillus caui* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soil of a peach tree[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2022, 72(1): 005216.
- [27] KIM OS, CHO YJ, LEE K, YOON SH, KIM M, NA H, PARK SC, JEON YS, LEE JH, YI HN, WON S, CHUN J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 3): 716-721.
- [28] 吕俊, 于存. 一株高效溶磷伯克霍尔德菌的筛选鉴定及对马尾松幼苗的促生作用[J]. 应用生态学报, 2020, 31(9): 2923-2934.
- LYU J, YU C. Screening and identification of an efficient phosphate-solubilizing *Burkholderia* sp. and its growth-promoting effect on *Pinus massoniana* seedling[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(9): 2923-2934 (in Chinese).
- [29] 王慧, 靳海洋, 陈哲, 靳鹏辉, 张燕辉, 胡天龙, 周蓉, 张静如, 蔺兴武, 谢祖彬. 稻田高效固氮蓝细菌的筛选鉴定及其促生潜力[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4043-4057.
- WANG H, JIN HY, CHEN Z, JIN PH, ZHANG YH, HU TL, ZHOU R, ZHANG JR, LIN XW, XIE ZB. Screening and identification of efficient nitrogen-fixing cyanobacteria with plant growth-promoting potential from paddy fields[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4043-4057 (in Chinese).
- [30] 刘清怡, 熊海容, 张莉. 一株耐盐葡萄球菌的分离鉴定及其特性分析[J]. 微生物学杂志, 2022, 42(2): 50-57.
- LIU QY, XIONG HR, ZHANG L. Isolation, identification, and characterization analysis of a salt-tolerant *Staphylococcus* strain[J]. Journal of Microbiology, 2022, 42(2): 50-57 (in Chinese).
- [31] AASFAR A, BARGAZ A, YAAKOUBI K, HILALI A, BENNIS I, ZEROUAL Y, MEFTAH KADMIRI I. Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 628379.
- [32] MOSA WFAE, SAS-PASZT L, FRAC M, TRZCIŃSKI P. Microbial products and biofertilizers in improving growth and productivity of apple: a review[J]. Polish Journal of Microbiology, 2016, 65(3): 243-251.
- [33] QIU ZG, PAUNGFUO-LONHIENNE C, YE J, GARCIA AG, PETERSEN I, di BELLA L, HOBBS R, IBANEZ M, HEENAN M, WANG WJ, REEVES S, SCHMIDT S. Biofertilizers can enhance nitrogen use efficiency of sugarcane[J]. Environmental Microbiology, 2022, 24(8): 3655-3671.
- [34] LIU W, TANG JC, ZHANG DH, JIANG X, LU BL, YANG WJ. Improvement of straw decomposition and rice growth through co-application of straw-decomposing inoculants and ammonium nitrogen fertilizer[J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1): 244.
- [35] SHARMA R, SHRIVAS VL, SHARMA S. Effect of substitution of chemical fertilizer by bioinoculants on plant performance and rhizospheric bacterial community: case study with *Cajanus cajan*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2021, 52(1): 373-386.
- [36] WU LX, WANG Y, LYU H, CHEN XD. Effects of a compound *Trichoderma* agent on *Coptis chinensis* growth, nutrients, enzyme activity, and microbial community of rhizosphere soil[J]. PeerJ, 2023, 11: e15652.
- [37] BRADÁČOVÁ K, SITTINGER M, TIETZ K, NEUHÄUSER B, KANDELER E, BERGER N, LUDEWIG U, NEUMANN G. Maize inoculation with microbial consortia: contrasting effects on rhizosphere activities, nutrient acquisition and early growth in different soils[J]. Microorganisms, 2019, 7(9): 329.
- [38] 丁建莉. 长期施肥对黑土微生物群落结构及其碳代谢的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- DING JL. Black soil microbial community structure and carbon metabolism in response to long-term fertilization[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017 (in Chinese).
- [39] 周晶. 长期施氮对东北黑土微生物及主要氮循环菌群的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- ZHOU J. Influence of long term nitrogen fertilization on microorganisms and major N-cycling related communities in black soil in Northeast China[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [40] 董思奇, 周彤, 张冰, 冯国忠, 周雪, 高强. 新型氮肥对玉米根际土壤固氮微生物群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(2): 360-367.
- DONG SQ, ZHOU T, ZHANG B, FENG GZ, ZHOU X, GAO Q. Effects of novel nitrogen fertilizers application on the community composition of nitrogen-fixing microorganisms in maize rhizosphere soils[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2024, 43(2): 360-367 (in Chinese).
- [41] 吴海宁, 黄志鹏, 唐秀梅, 熊发前, 钟瑞春, 贺梁琼, 韩柱强, 蒋菁, 刘菁, 唐荣华. 氮肥减施对花生根际土壤固氮微生物多样性的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(16): 93-97.
- WU HN, HUANG ZP, TANG XM, XIONG FQ, ZHONG RC, HE LQ, HAN ZQ, JIANG J, LIU J, TANG RH. Effect of nitrogen reduction on diversity of soil nitrogen-fixing microbes in peanut rhizosphere[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(16): 93-97 (in Chinese).
- [42] LI TY, HONG XY, LIU SR, WU XQ, FU S, LIANG Y, LI JH, LI R, ZHANG C, SONG XT, ZHAO HW, WANG DF, ZHAO FL, RUAN YZ, JU XT. Cropland degradation and nutrient overload on Hainan Island: a review and

- synthesis[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 313: 120100.
- [43] WANG YN, FU X, WU DM, WANG MD, LU KD, MU YJ, LIU ZG, ZHANG YH, WANG T. Agricultural fertilization aggravates air pollution by stimulating soil nitrous acid emissions at high soil moisture[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(21): 14556-14566.
- [44] 李晓慧. 不同作物与施肥对黑土氨氧化微生物的影响[D]. 哈尔滨: 中国科学院研究生院(东北地理与农业生态研究所), 2013.
LI XH. Impact of different crops and fertilization on ammonia oxidizing bacteria and Archaea in black soil[D]. Harbin: Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, 2013 (in Chinese).
- [45] 李亚男. 长期施肥对黑土碳、氮循环的影响及微生物调控作用[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.
LI YN. Effects of long-term fertilization on carbon and nitrogen cycle and microbial regulation in black soil[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [46] 宋玉清, 史书强, 李启辉, 马麟祥. 玉米联合固氮菌剂接种效果初探[J]. *辽宁农业科学*, 1993(6): 52-53.
- [47] 陈三凤, 李季伦, 姚腾云, 于锦香. 玉米联合固氮工程菌的增产和节约氮肥的效果[J]. *土壤肥料*, 2002(1): 37-40.
CHEN SF, LI JL, YAO TY, YU JX. Effect of increasing maize yields and saving nitrogen fertilizer by inoculation of *Azospirillum brasilense* UB37[J]. *Soils and Fertilizers*, 2002(1): 37-40 (in Chinese).
- [48] STANCHEVA I, DIMITROV I, KALOYANOVA N, DIMITROVA A, ANGELOV M. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on photosynthetic enzyme activities and grain yield in maize[J]. *Agronomie*, 1992, 12(4): 319-324.
- [49] GAO Q, YANG YF, FENG JJ, TIAN RM, GUO X, NING DL, HALE L, WANG MM, CHENG JM, WU LW, ZHAO MX, ZHAO JS, WU LY, QIN YJ, QI Q, LIANG YT, SUN B, CHU HY, ZHOU JZ. The spatial scale dependence of diazotrophic and bacterial community assembly in paddy soil[J]. *Global Ecology and Biogeography*, 2019, 28(8): 1093-1105.
- [50] ZENG Y, GUO L, GAO YQ, CUI LW, WANG MM, HUANG L, JIANG MY, LIU Y, ZHU YX, XIANG H, LI DF, ZHENG YN. Formation of NifA-P_{II} complex represses ammonium-sensitive nitrogen fixation in diazotrophic proteobacteria lacking NifL[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(7): 114476.
- [51] GUSHGARI-DOYLE S, SCHICKLBERGER M, LI YV, WALKER R, CHAKRABORTY R. Plant growth promotion diversity in switchgrass-colonizing, diazotrophic endophytes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 730440.
- [52] BENEDUZI A, COSTA PB, PARMA M, MELO IS, BODANESE-ZANETTINI MH, PASSAGLIA LMP. *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(Pt 1): 128-133.
- [53] BENEDUZI A, PERES D, da COSTA PB, BODANESE ZANETTINI MH, PASSAGLIA LMP. Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil[J]. *Research in Microbiology*, 2008, 159(4): 244-250.
- [54] SOLANKI AC, GURJAR NS, SHARMA S. Co-inoculation of non-symbiotic bacteria *Bacillus* and *Paraburkholderia* can improve the soybean yield, nutrient uptake, and soil parameters[J]. *Molecular Biotechnology*, 2023: 1-13.
- [55] XU SZ, XING YH, LIU S, HUANG QY, CHEN WL. Role of novel bacterial *Raoultella* sp. strain X13 in plant growth promotion and cadmium bioremediation in soil[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(9): 3887-3897.
- [56] KUMAR A, SINGH S, MUKHERJEE A, RASTOGI RP, VERMA JP. Salt-tolerant plant growth-promoting *Bacillus pumilus* strain JPV511 to enhance plant growth attributes of rice and improve soil health under salinity stress[J]. *Microbiological Research*, 2021, 242: 126616.
- [57] 张明聪, 何松榆, 金喜军, 王孟雪, 任春元, 战英策, 胡国华, 张玉先. 氮磷调控对大豆-玉米轮作下植株光合生产能力和产量的影响[J]. *大豆科学*, 2018, 37(6): 883-890.
ZHANG MC, HE SY, JIN XJ, WANG MX, REN CY, ZHAN YC, HU GH, ZHANG YX. Effects of nitrogen and phosphorus regulation on photosynthetic capacity and yield under soybean and maize rotation[J]. *Soybean Science*, 2018, 37(6): 883-890 (in Chinese).
- [58] 王秀丽, 张凤荣, 朱泰峰, 周建, 吴昊, 杨黎芳. 北京山区土壤有机碳分布及其影响因素研究[J]. *资源科学*, 2013, 35(6): 1152-1158.
WANG XL, ZHANG FR, ZHU TF, ZHOU J, WU H, YANG LF. The distribution and impact factors of soil organic carbon in mountainous areas of Beijing[J]. *Resources Science*, 2013, 35(6): 1152-1158 (in Chinese).
- [59] AL METHYEB M, RUPPEL S, EICHLER-LÖBERMANN B, VASSILEV N. The combined applications of microbial inoculants and organic fertilizer improve plant growth under unfavorable soil conditions[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(7): 1721.